Die reversible Depolymerisierung der Proteinhülle des Bakteriophagen fr

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Dieter Schubert
aus Chemnitz

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547611_0115

Die reversible Depolymerisierung der Proteinhülle des Bakteriophagen fr

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Dieter Schubert
aus Chemnitz

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 26. 6. 1969

Dekan: Prof. Dr. A. Seilacher

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. F. A. Anderer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bayer

Meinem verehrten Chef und Lehrer

Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Gerhard Schramm (†)

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

B. Experimentelle Methoden

1. Die Durchführung der reversiblen Depolymerisierung

1.1. Viruspräparation

1.2. Spaltung des Virions und Entfernen der RNS

1.3. Die Durchführung des Reaggregationsprozesses

1.4. Die Bestimmung der Proteinkonzentration

2. Die Messung des Zirkular-Dichroismus (ZD)

2.1. Apparatur

2.2. Vorbereitung der Proben und Durchführung der Messungen

3. Sonstige Methoden

C. Ergebnisse und Diskussion

1. Die reversible Depolymerisierung der Proteinhülle des Phagen fr

1.1. Das Ergebnis des Grundversuches

1.2. Eigenschaften des reaggregierten Materials

1.3. Ein andersartiges Reaggregationsprodukt : Multischalen

1.4. Folgerungen

2. Konformationsänderungen bei der reversiblen Depolymerisierung des fr-Proteins

2.1. Vorbemerkungen zur Problemstellung und zur Wahl der Meßmethode

2.2. Die ZD-Signale im Verlauf des Reaggregationsprozesses

2.3. Trennung von p_H- und Lösungsmitteleffekten

2.4. Überlegungen zum Zustandekommen der ZD-Kurven für reaggregierte Proteinhüllen

2.5. Die Beiträge von Modellstrukturen zur Konformation der Peptidkette

2.6. Die Ursachen der Strukturänderungen

3. Vergleichende Untersuchungen am TMV-Protein: Konformationsänderungen bei der reversiblen Depolymerisierung

3.1. Vorbemerkungen

3.2. Die ZD-Signale im Verlauf des Reaggregationsprozesses

3.3. Folgerung

D. Zusammenfassung

E. Literaturverzeichnis

A. Einleitung

Mehr als jedes andere biologische System haben die "einfachen" Viren - Viren, die eine regelmäßige Struktur besitzen und nur aus Nukleinsäure und Protein bestehen - zum Fortschritt der molekularbiologischen Forschung beigetragen. Die Einfachheit des Aufbaus dieser Partikel hat es gestattet, ihre chemischen und physikalischen Eigenschaften und die ihrer Komponenten sowie den Zusammenhang dieser Eigenschaften mit der biologischen Funktion der Moleküle weitgehend aufzuklären. Das Studium der einfachen Viren hat damit erstmals die Zurückführung einiger fundamentaler Besonderheiten der belebten Materie auf chemisch-physikalische Gesetzmäßigkeiten ermöglicht.

Die hohe Symmetrie der einfachen Viren hat frühzeitig die Frage nach den Prinzipien hervorgerufen, die ihrer Struktur und Entstehung zugrundeliegen. Es ist das Verdienst von Caspar und Klug, dieses Problem auf eine auch für Untersuchungen komplizierterer biologischer Systeme richtungsweisende Art gelöst zu haben. Die von diesen Autoren entwickelte Theorie [1] gestattet es, alle über die Struktur der Viren bekannten Gesetzmäßigkeiten auf allgemeine geometrisch-physikalische Prinzipien zurückzuführen. Die Theorie, die beide Hauptgruppen der einfachen Viren - stäbchenförmige und sphärische (ikosaedrische) - umfaßt, hat überdies eine große Bedeutung für das Verständnis des Prozesses der Virusvermehrung.

Die Möglichkeit des "self-assembly", der spontanen Bildung des Viruspartikels aus seinen Komponenten, spielt in den Betrachtungen von Caspar und Klug eine entscheidende Rolle. Nach der Theorie dieser Autoren ist der Vorgang des self-assembly

eine Folgeerscheinung des physikalischen Konstruktionsprinzips der Proteinhülle des Virions und somit unabhängig von der Anwesenheit der übrigen Viruskomponenten. Die experimentelle Grundlage der Überlegungen bilden Versuche an dem stäbchenförmigen Tabakmosaikvirus (TMV). Die Versuche haben gezeigt, daß Proteinuntereinheiten und RNS des TMV in vitro zu infektiösen, vom Virus nicht unterscheidbaren Partikeln aggregieren können, daß aber überdies bereits monomere, nukleinsäurefreie Proteinuntereinheiten unter geeigneten Bedingungen spontan in virusähnliche Proteinstäbchen übergehen [2 - 4]. In diesem Fall ist die zur Bildung der Proteinhülle nötige Information offenbar schon in der Struktur der Proteinuntereinheit enthalten. Alle Versuche, die von der Theorie geforderte Möglichkeit eines solchen self-assembly-Prozesses auch für das Hüllprotein sphärischer Viren zu demonstrieren, sind jedoch bisher gescheitert. Es gelang lediglich, Proteinhüllen sphärischer Viren aus intakten Viruspartikeln durch Entfernen der Nukleinsäure darzustellen [5 - 7] sowie eine Reaggregation von Proteinuntereinheiten zu virusähnlichen Gebilden bei gleichzeitigem Einbau von Nukleinsäure durchzuführen [8 - 10]. Weiter konnte die Anwesenheit von virusähnlichen Proteinhüllen in virusinfizierten Zellen nachgewiesen werden [11 - 13].

In der vorliegenden Arbeit wird nun ein Prozeß beschrieben, der den experimentellen Beweis für die von der Caspar-Klugschen Theorie geforderte Möglichkeit der selbstgesteuerten Aggregation von Hüllprotein-Untereinheiten sphärischer Viren zu virusähnlichen Proteinhüllen liefert. Als Ausgangsmaterial dient der Bakteriophage fr, ein RNS-Virus mit Ikosaedersymmetrie, das ein Molekulargewicht von $4 \cdot 10^6$ g/Mol [14] und einen Durchmesser von 26 mμ [15] besitzt. Das Virus gehört, nach

der Terminologie von Caspar und Klug, zur Triangulationsnummer T = 3, sein Hüllprotein besteht aus 180 Untereinheiten vom Molekulargewicht 14300 [16]. Der durchgeführte Prozeß beginnt mit der Spaltung der Viruspartikel in monomere Proteinuntereinheiten und Nukleinsäure mit Eisessig nach der Methode von Fraenkel-Conrat ("Essigsäuremethode") [17] und führt nach der Abtrennung der Nukleinsäure und verschiedenen Zwischenschritten schließlich zur Ausbildung von Aggregaten, die in allen wesentlichen Eigenschaften mit der Proteinhülle der Viruspartikel übereinstimmen. - Im weiteren wird dieser Prozeß einer reversiblen Depolymerisierung der Proteinhülle hinsichtlich seiner Auswirkungen auf die Konformation der Proteinuntereinheit untersucht. Die durchgeführten Experimente, bei denen die empfindliche Abhängigkeit des Zirkular-Dichroismus (ZD) eines Proteinmoleküls von seiner Sekundärstruktur ausgenützt wird, führen zu einer ausführlichen Beschreibung der im Verlauf des Prozesses auftretenden Konformationsänderungen und zu einer weitgehenden Klärung der diese Änderungen auslösenden Mechanismen.

B. Experimentelle Methoden

1. Die Durchführung der reversiblen Depolymerisierung

1.1. Viruspräparation

Das Virus wurde nach der Methode von Hoffmann-Berling et al. [14] vermehrt. Die Anreicherung des Phagen aus dem Bakterienlysat wurde jedoch nicht durch Ammonsulfatfällung, sondern durch Ultrafiltration [18] vorgenommen. Die abschließende Reinigung erfolgte durch zweimalige Zentrifugation im CsCl-Dichtegradienten. - ^{32}P-markiertes Virus wurde nach dem von Heisenberg [19] beschriebenen Verfahren gewonnen.

1.2. Spaltung des Virions und Abtrennung der RNS

Zur Depolymerisierung der Proteinhülle des fr-Partikels und zur Abtrennung der Virus-RNS wurde die von Fraenkel-Conrat beschriebene Essigsäure-Methode [17] mit geringfügigen Modifikationen benutzt. Zu 1 Volumen einer Lösung von fr (20 - 50 mg/ml) in TS-Puffer (0,02 m Tris/HCl, p_H 7,6 + 0,15 m NaCl) wurden 2 Volumen Eisessig zugefügt. Die Mischung wurde unter gelegentlichem Schütteln 15 Min. lang im Eisbad gehalten. Während dieser Zeit präzipitierte der Hauptteil der RNS und wurde durch Zentrifugation (15 Min. bei 3000 Upm in der Stock-Zentrifuge, 30 Min. bei 45000 Upm im Rotor Ti 50 der Spinco L 2 - Zentrifuge) entfernt. Danach wurde der Überstand der Zentrifugation, der etwa 80 % des Virusproteins enthielt, mit dem gleichen Volumen kalten Wassers verdünnt.

Bei den ersten Versuchen, für die salzfreie Viruslösungen zur Spaltung benutzt wurden, wurde die Proteinlösung nach dem Verdünnungsschritt durch säulenchromatographische Trennung auf Sephadex G 50 oder Biogel P 30 nachgereinigt. Als Elutionslösung wurde 5,5 m (33 Vol.-%) Essigsäure verwendet. Durch Zufügung von ^{32}P-markiertem Virus ($1 \cdot 10^5$ Zerfälle pro Min. und mg Protein) konnte gezeigt werden, daß durch diese Trennung die ^{32}P-Zählrate pro mg Protein in den Hauptfraktionen von etwa 5 % des Ausgangsmaterials vor der Trennung auf weniger als 0,05 % verringert wurde. Die letztgenannte Zählrate entspricht einer Verunreinigung des Proteins mit RNS von weniger als $1,5 \cdot 10^{-2}$ Gew.-%. Der Wert von E(260)/E(280), dem Verhältnis der Extinktionskoeffizienten bei 260 und 280 mμ, beträgt für diese Lösungen 0,590 ± 0,010 (ohne Korrektur für Lichtstreuung).

Bei späteren Versuchen wurde durch die Erhöhung der Salzkonzentration bei der Spaltung erreicht, daß nach mehrstündiger Dialyse der Proteinlösung gegen 5,5 m oder 1 m Essigsäure auch ohne säulenchromatographische Trennung das E(260)/E(280)-Verhältnis zwischen 0,595 und 0,615 lag. Dieser Wert entspricht, wie man unter Verwendung der in Ref. 14 angegebenen Extinktionskoeffizienten für fr-RNS und dem in dieser Arbeit ermittelten Extinktionskoeffizienten für fr-Protein errechnen kann, einem RNS-Gehalt von weniger als 0,15 Gew.-%. Das so erhaltene Protein wurde für die meisten der durchgeführten Untersuchungen verwendet.

1.3. Die Durchführung des Reaggregationsprozesses

Auch die weitere Behandlung des Proteins schließt sich an die Methode von Fraenkel-Conrat an. Die Proteinlösung wurde etwa 24 Stunden lang gegen H_2O dialysiert. Wenn eine Konzentrierung des Proteins nötig war (wie im Falle von Präparaten, die durch Säulenchromatographie von RNS-Verunreinigungen befreit wurden), wurde die Dialyse zeitweise als Druckdialyse ausgeführt. Danach wurde die Proteinlösung durch Zugabe von 0,02 m NaOH auf einen p_H-Wert von 7 bis 8 gebracht. Bei diesem Schritt löste sich der manchmal gebildete Niederschlag stets vollständig auf. Die Lösung, deren Proteinkonzentration meist zwischen 0,5 und 2,0 mg/ml lag, wurde abschließend für mindestens 12 h gegen 0,02 m Na-Phosphatpuffer (p_H 7,6) dialysiert. Für die Untersuchung des Sedimentationsverhaltens der Endprodukte dieses Prozesses enthielt die Pufferlösung oft noch 0,1 Mol/l NaCl, um Auswirkungen von Ladungseffekten auf die Sedimentationskonstante auszuschalten. Alle Zentrifugations- und Dialysierschritte wurden bei 4° C durchgeführt.

1.4. Die Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Lösungen wurde durch Messung der UV-Absorption bei 277 mμ, dem Maximum des langwelligen Teils des Absorptionsspektrums, bestimmt. Lösungsmittel war in allen Fällen 5,5 m Essigsäure. Zur Ermittlung von molaren Extinktionskoeffizienten wurde ein mittleres Molgewicht des Aminosäurerestes von 111 benutzt (berechnet aus den Ergebnissen der Sequenzanalyse von Wittmann-Liebold [16]).

Zur Auswertung der Absorptionsmessungen mußte das Verhältnis von Extinktionskoeffizient und Trockengewicht bestimmt werden. Dazu wurden Proteinpräparate mit E(260)/E(280) < 0,60 gegen H_2O dialysiert, gefriergetrocknet und in einer Trockenpistole über P_2O_5 bei 70° C für 24 - 60 Stunden nachgetrocknet. Proben von 2 bis 6 mg Protein wurden dann auf die Schale einer Cahn-RG-Elektrowaage gebracht, die Anzeige wurde auf den Zeitpunkt des Öffnens der Trockenpistole extrapoliert. Die Proben wurden anschließend in einen Meßkolben übergeführt und durch Zugabe von zuerst 1 Volumen Essigsäure und später 2 Volumen H_2O gelöst. Danach wurde die 277 mμ -Absorption der Proben gemessen.

2. ZD-Messungen

2.1. Apparatur

Für die Messung des Zirkular-Dichroismus, des Unterschiedes der Extinktion eines Stoffes für links- und rechtszirkular polarisiertes Licht, stand ein Spektrometer Modell ORD/UV-5 der Firma Japan Spectroscopic Co. zur Verfügung. Dieses Gerät, mit dem Messungen im Wellenlängenbereich von 185 bis 700 mμ ausgeführt werden können, entspricht in seiner Funktionsweise der zuerst von Grosjean et al. beschriebenen Apparatur [20 - 22] und benutzt den elektrooptischen Effekt eines Kristalls aus Kaliumdihydrogenphosphat (Pockels-Effekt [23]) zur Erzeugung von zirkularpolarisiertem Licht. Das Gerät erwies sich in seiner kommerziellen Form jedoch zur Durchführung der vorgesehenen Messungen als zu wenig empfindlich. Die Apparatur wurde deshalb weitgehend modifiziert. Das Blockschaltbild der modifizierten Anlage ist in Abb. 1 gezeigt.

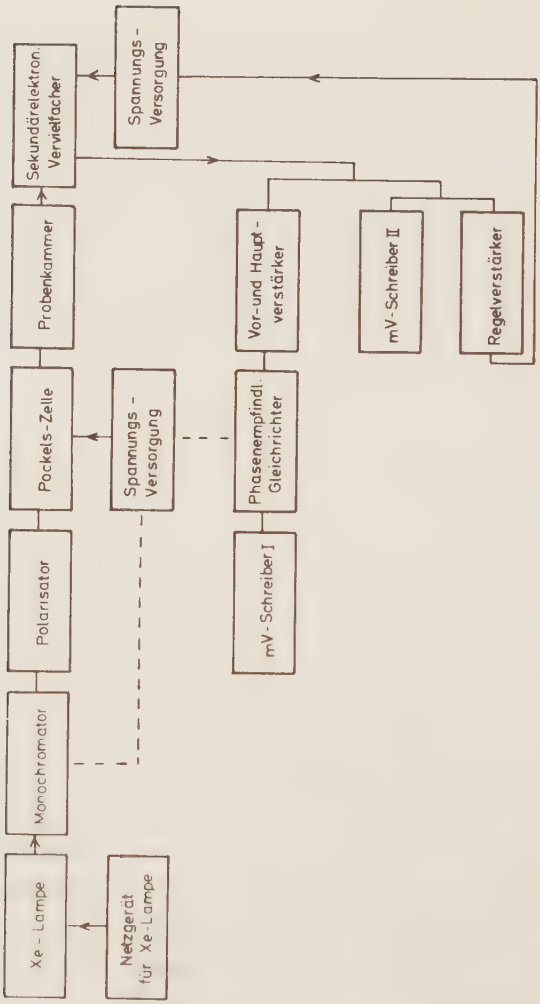


Abb. 1. Blockschaltbild der ZD-Apparatur

Das den Polarisator verlassende monochromatische, linear polarisierte Lichtbündel wird beim Durchlaufen der Pockels-Zelle zu einem Strahl mit sich periodisch (ν = 50 Hz) zwischen links- und rechtszirkularer Polarisation änderndem Polarisationszustand. Enthält die Probenkammer eine Zirkular-Dichroismus aufweisende Substanz, so wird die periodische Änderung des Polarisationszustandes in eine periodische Intensitätsschwankung umgewandelt. Die Ausgangsspannung des Sekundärelektronen-Vervielfachers (SEV) enthält dann einen Wechselspannungs- und einen Gleichspannungsanteil. Die 50 Hz-Komponente wird verstärkt, phasenempfindlich gleichgerichtet und einem Schreiber zugeführt. Zwischen dessen Anzeige U_1, dem Wert U_2 der Gleichspannungskomponente am Ausgang des SEV und dem Koeffizienten der "zirkular-dichroitischen Extinktion", der Differenz der Extinktionskoeffizienten für links-und rechtszirkular polarisiertes Licht ($\Delta E = E_L - E_R$), besteht die Beziehung

$$\Delta E = \Delta\varepsilon \cdot c \cdot d = K \cdot \frac{U_1}{U_2}$$

Dabei ist $\Delta\varepsilon$ der molare zirkular-dichroitische Extinktionskoeffizient; die Konzentration c wird in Mol/Liter, die Schichtdicke d in cm gemessen. K ist eine Apparatekonstante, die mit einer Substanz vom bekannten $\Delta\varepsilon$ bestimmt werden muß. - Die Spannung U_2 wird durch eine Regelung der Dynodenspannungen des SEV konstantgehalten. Damit entspricht die Anzeige von Schreiber I bis auf einen konstanten Faktor der zirkular-dichroitischen Extinktion. Zur Kalibrierung diente eine Probe von 17-oxo-3ß-hydroxy-5-Androstan^{22} ($\Delta\varepsilon$(304 mμ) = 3,31 cm^2/Millimol)* (diese Substanz, die von der Firma Jouan zur Kalibrierung ihres

---

* Alle in dieser Arbeit angegebenen Zahlenwerte für die Extinktion sind dekadische Werte.

"Dichrograph"-Spektrometers in den Handel gebracht wird, wurde freundlicherweise von Herrn Dr. H. Ehrhardt, Pharmazeutisches Institut der Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt).

Die durchgeführten Änderungen der kommerziellen Ausführung der Apparatur betreffen sowohl den optischen als auch den elektronischen Teil der Anlage. Durch Verbesserung des Strahlenganges konnten die Intensitätsverluste an den Komponenten des optischen Systems für $\lambda < 210$ mμ stark reduziert werden. Änderungen am elektronischen System erlaubten die Benutzung von kleineren SEV-Strömen und damit eine Herabsetzung der Dynodenspannung des SEV. Hierdurch wurde, vor allem für den kurzwelligen Teil des Meßbereiches, eine erhebliche Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses erzielt. Gleichzeitig wurde erreicht, daß die in der kommerziellen Ausführung der Apparatur auftretenden Artefakte (scheinbare Abweichungen vom Lambert-Beerschen Gesetz sowie vorgetäuschte Cotton-Effekte bei absorbierenden, aber optisch inaktiven Substanzen) für Proben mit $E \leqslant 1{,}5$ trotz Erhöhung der Empfindlichkeit der Anlage nicht mehr nachweisbar waren. Die Empfindlichkeit des Gerätes, die durch das Verhältnis $\Delta E/E$ von zirkular-dichroitischer zu isotroper Extinktion für das kleinste nachweisbare Signal beschrieben wird, konnte damit von etwa $20 \cdot 10^{-5}$ auf $3 \cdot 10^{-5}$ verbessert werden (bei Benutzung einer Zeitkonstanten der U_1-Messung von $\tau = 10$ sec für $\lambda > 210$ mμ bzw. $\tau = 35$ sec für $\lambda < 210$ mμ). Dieser Wert wird vor allem durch zeitlich nicht konstante Störsignale bestimmt, die von der Pockels-Zelle verursacht werden und zu Nullpunktschwankungen von U_1 führen. Er läßt sich deshalb auch durch Erhöhung von τ nicht verbessern.

Zur Aufnahme der Proben dienten kommerzielle Küvetten aus Suprasil, wobei auf Spannungsfreiheit der Küvettenfenster geachtet wurde (mechanische Spannungen in den Quarzfenstern führen zu Basisverschiebungen der ZD-Signale). Die Verwendung von Essigsäure als Lösungsmittel zwang wegen der hohen UV-Absorption dieser Substanz zur Benutzung kleiner Schichtdicken. Der größte Teil der Messungen wurde deshalb mit Küvetten der Schichtdicken d = 0,013 bis 0,50 mm (Hellma 210/3-QS) ausgeführt. Für die Messungen in Pufferlösungen fanden daneben auch Küvetten mit Dicken zwischen 1 und 10 mm Verwendung (Hellma 100-QS). Die Bestimmung der Schichtdicke für $d \leq 0{,}050$ mm erfolgte durch Messung der Interferenzen, die sich infolge Vielfachreflexion an den parallelen Wänden der leeren Küvette ausbilden [24]. Diese Messungen wurden im Spektralbereich von 1 µ bis 2,5 µ auf einem Beckman DK 2 - Spektrophotometer ausgeführt. Für die Küvetten mit $d \geq 0{,}10$ mm wurde die Dickenangabe des Herstellers benutzt. - Bei den ZD-Messungen wurde die Schichtdicke so gewählt, daß in dem betrachteten Wellenlängenintervall die Extinktion der Probe kleiner als 1,5 blieb. Dabei trug die Extinktion des Lösungsmittels höchstens die Hälfte dieses Wertes bei.

2.2. Vorbereitung der Proben und Durchführung der Messungen

Zur Charakterisierung der im Verlauf des Prozesses der reversiblen Depolymerisierung auftretenden Proteinstrukturen durch ZD-Messungen wurden die Proteinlösungen nach der Spaltung der Viruspartikel in 11 m (67 Vol.-%) Essigsäure, nach dem Entfernen der RNS durch Zentrifugation und dem Verdünnen des Präparates mit dem gleichen Volumen H_2O gegen Lösungen der gewünschten Essigsäurekonzentration dialysiert. Das Außendialysat

wurde dabei hinreichend oft gewechselt. Für die ZD-Messungen in 11 m Essigsäure unterblieb der Verdünnungsschritt. Die den abschließenden Schritten des Prozesses entsprechenden Proben - Protein in verdünnter NaOH (p_H 7,6) bzw. in 0,02 m Phosphatpuffer (p_H 7,6) - wurden nach der unter 1.3 beschriebenen Methode hergestellt. Die letztgenannte Probe wurde für einige Messungen noch einer Zentrifugation im Rohrzuckergradienten (linearer Gradient von 5 - 20 % Saccharose in Phosphatpuffer, unterschichtet mit 60 %iger Saccharoselösung; Zentrifugation für 3 h bei 40000 Upm im Rotor SW 41 der Spinco L 2 - Zentrifuge) unterworfen, um eine vollständige Abtrennung von niedermolekularem Material zu erreichen. Alle Präparationsschritte wurden bei 4° C durchgeführt.

Um sicherzustellen, daß die benutzten Proteinpräparate kein partiell abgebautes oder auf andere Weise irreversibel geschädigtes Protein enthielten, wurde ein Teil jedes Präparates dem vollständigen Reaggregationsprozeß unterworfen. Die Proben wurden dann im Elektronenmikroskop untersucht; häufig wurde zusätzlich noch das Sedimentationsverhalten in der Ultrazentrifuge kontrolliert. In allen Fällen wurden die in Abschnitt C 1 beschriebenen Ergebnisse erhalten.

Die Proteinlösungen wurden vor Beginn der ZD-Messungen niedertourig zentrifugiert und bei 4° C aufbewahrt. Die Messungen wurden an Proben aus diesen Stammlösungen bei (25 ± 1)° C durchgeführt. Das ZD-Signal einer solchen Probe blieb über mehrere Stunden hin konstant. Selbst während der für den Temperaturausgleich benötigten Zeit wurden keine Änderungen der Amplituden gefunden. Die Proteinkonzentration der Lösungen

betrug im allgemeinen 0,5 bis 3 mg/ml. Die Messungen in 11 m und 5,5 m Essigsäure erforderten wegen der benötigten kleinen Schichtdicke Proteinkonzentrationen von 5 bis 20 mg/ml. Reaggregationsprodukte wurden in Konzentrationen von 0,1 bis 1,0 mg/ml verwendet.

3. Sonstige Methoden

UV-Absorptionsmessungen zur Konzentrations- und Reinheitsbestimmung wurden auf einem Zeiß MQ III - Spektralphotometer durchgeführt. Für Messungen über einen breiten Wellenlängenbereich wurde ein registrierendes Spektralphotometer vom Typ Beckman DK 2 benutzt.

Untersuchungen des Sedimentationsverhaltens wurden mit einer analytischen Ultrazentrifuge des Typs Spinco Modell E unter Benutzung der Schlierenoptik vorgenommen. Die Temperatur in der Meßzelle betrug $(20,0 \pm 0,1)^{\circ}$ C.

Zu Messungen der ^{32}P-Zerfallsrate diente ein Flüssigkeitsszintillationszähler der Firma Packard (Tri-Carb, Modell 3003).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden mit der freundlichen Unterstützung von Herrn Dr. H. Frank und Herrn G. Berger auf einem Siemens Elmiskop I A durchgeführt. Die Präparation der Proben erfolgte durch Negativkontrastierung mit Uranylacetat oder Phosphorwolframsäure.

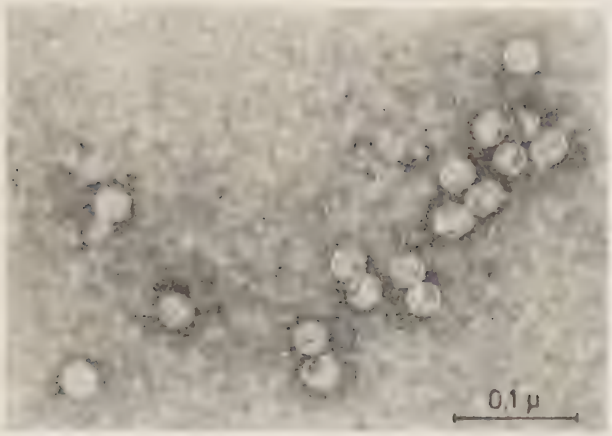
C. Ergebnisse und Diskussion

1. Die reversible Depolymerisierung der Proteinhülle des Phagen fr

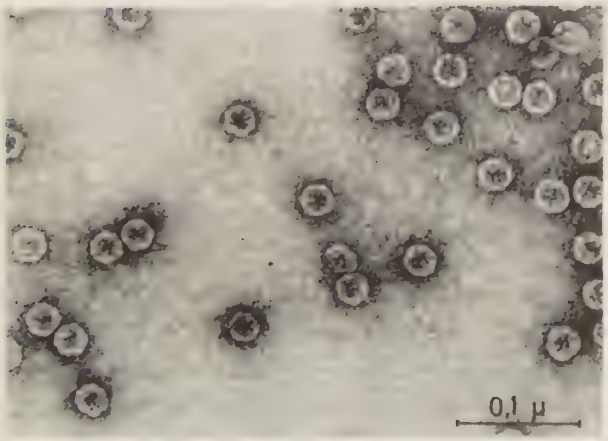
1.1. Das Ergebnis des Grundversuches

Der in Abschnitt B 1 beschriebene Prozeß, der als Einzelschritte die Spaltung des Viruspräparates in Protein und RNS durch 11 m Essigsäure, die Abtrennung der RNS und das langsame Neutralisieren der essigsauren Lösung durch Dialyse gegen H_2O und nachfolgende Zugabe von NaOH umfaßt, schließt mit der Dialyse der Proteinlösung gegen 0,02 m Phosphatpuffer (p_H 7,6) ab. Bei diesem Schritt geht die bis dahin klare Lösung in eine stark opaleszierende über. Die hochmolekularen Aggregate, die Ursache dieser Opaleszenz sein müssen, lassen sich auch durch niedertourige Zentrifugation (10 min bei 3000 Upm in der Stock-Laborzentrifuge) nicht sedimentieren. Unter dem Elektronenmikroskop erweisen sich die Aggregate bei Proteinkonzentrationen von weniger als 1 mg/ml als kugelförmige Partikel, die dem intakten Virion zumindest sehr ähnlich sind. Eine elektronenmikroskopische Aufnahme der Partikel, zusammen mit der Aufnahme eines Viruspräparates, zeigt die Abb. 2.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, daß nahezu alles reaggregierte Material in Form von virusähnlichen Teilchen vorliegt. Dieses Ergebnis ist unabhängig vom Gehalt des Proteins an RNS-Verunreinigungen, der bei einigen Proben unter $1{,}5 \cdot 10^{-2}$ Gew.-% lag (vergl. B 1.2). Tubuläre oder sonstige nicht-virusähnliche Partikel treten unter den



2a



2b

Abb. 2

a: Reaggregiertes fr-Protein: virusähnliche Partikel
b: fr-Viruspartikel

beschriebenen Bedingungen nicht auf. Eine interessante, von der in Abb. 2 a gezeigten abweichende Partikelform wurde jedoch bei höheren Proteinkonzentrationen oder niedrigeren p_H-Werten gefunden. Hierüber wird in Abschnitt C 1.3 berichtet.

Zur Klärung der Natur des Prozesses, der zu den virusähnlichen Proteinaggregaten führt, wurde der Aggregationszustand des in 11 m Essigsäure gelösten Proteins untersucht. Hierzu wurden in der Ultrazentrifuge Molekulargewichtsbestimmungen nach der Methode des Sedimentationsgleichgewichts [25] durchgeführt. Die Bestimmung ergab für Proteinlösungen in 11 m Essigsäure und in 11 m Essigsäure plus 0,1 m NaCl einen Wert von 16000 g/Mol, wobei das Produkt $\bar{v}\varrho$ aus dem partialspezifischen Volumen des Proteins und der Dichte des Lösungsmittels zu 0,75 angenommen wurde [26, 27]. Dieser Wert stimmt im Rahmen der Genauigkeit der Methode mit dem durch chemische Verfahren bestimmten Molekulargewicht der Proteinuntereinheit von 14300 g/Mol [16] überein. Wie im Falle des TMV [27] wird also die Proteinhülle des fr-Partikels durch 11 m Essigsäure in monomere Untereinheiten aufgespalten.

Eine weitere Bestätigung dafür, daß die in Abb. 2 a gezeigten Proteinaggregate keine nicht abgebauten Virushüllen aus dem Ausgangsmaterial darstellen, lieferte die elektronenmikroskopische Untersuchung des dem Reaggregationsprozeß bei einer Essigsäurekonzentration von 5,5 Mol/l entnommenen Materials. In dieser Probe konnten keine virusähnlichen Partikel nachgewiesen werden.

Hiermit ist gezeigt, daß die als Ergebnis des in Abschnitt B 1 beschriebenen Prozesses erhaltenen virusähnlichen Partikel nukleinsäurefreie Aggregationsprodukte von monomeren Proteinuntereinheiten des fr-Virions sind.

1.2. Eigenschaften des reaggregierten Materials

Unter Benutzung verschiedenartiger, vorwiegend physikalischer Methoden wurde eine weitere Charakterisierung der Reaggregationsprodukte versucht. Die bisher erhaltenen Ergebnisse sind im folgenden kurz beschrieben.

Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen ergibt, daß der Durchmesser der virusähnlichen Teilchen im Rahmen der Meßgenauigkeit (± 10 %) mit dem der Viruspartikel übereinstimmt. Ein genauer Vergleich der Oberflächenstruktur beider Arten von Partikeln konnte bisher wegen des mangelnden Kontrasts der Abbildungen nicht durchgeführt werden.

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen ermöglichen auch eine Aussage über die Struktur des Kugelinneren. Die Aufnahmen zeigen nämlich häufig Partikel, deren Inneres vollständig mit Kontrastierungsmittel angefüllt ist. Bei manchen Präparaten findet man diese Erscheinung bei nahezu allen Teilchen (Abb. 3). Das Auftreten derartiger Partikel wird begünstigt durch verkürzte Dauer der Dialyse gegen Phosphatpuffer und durch längere Einwirkung des Kontrastierungsmittels bei der Präparation der Proben, vor allem aber durch Verwendung von Phosphorwolframsäure anstelle von Uranylacetat als Kontrastierungsmittel. Bei den virusähnlichen Teilchen handelt es sich also nicht um kompakte Proteinaggregate, sondern um Kugelschalen (genauer wohl: Ikosaederschalen).

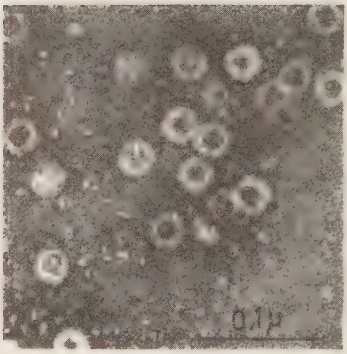


Abb. 3

Reaggregiertes fr-Protein:

mit Kontrastierungsmittel angefüllte virusähnliche Partikel

In der Ultrazentrifuge sedimentieren die Proteinhüllen mit einer Sedimentationskonstanten $s_o = 68$ (im Gegensatz zu $s_o = 80$ für intakte Viren). Die niedermolekularen Teilchen entsprechende Bande ($s_o = 2$) enthält nur einen kleinen Bruchteil des gesamten Materials. Eine Abschätzung ergibt, daß 70 - 90 % des Proteins mit der 68 s-Bande sedimentieren. Dieses Ergebnis wird durch Untersuchungen des Sedimentationsverhaltens der Proben im Rohrzuckergradienten bestätigt.

Der serologische Vergleich von reaggregierten Proteinhüllen und intakten Viren erweist, daß beide Arten von Partikeln in ihrer Antikörper-Bindungskapazität übereinstimmen [28, 29]. Da die Stärke der Antigen-Antikörper-Bindung ein empfindliches Maß für die Oberflächenstruktur eines Proteins ist, kann aus diesem Versuch auf eine weitgehende Übereinstimmung dieser Struktur zwischen Proteinhülle und Viruspartikel geschlossen werden. - Wie durch Messungen der elektrophoretischen

Beweglichkeit [29] gezeigt wurde, besteht diese Übereinstimmung auch hinsichtlich der Differenz zwischen der Zahl der negativ und der positiv geladenen Gruppen.

Die reaggregierten leeren Proteinhüllen verhalten sich auch bezüglich des in dieser Arbeit beschriebenen Prozesses der reversiblen Depolymerisierung wie die Proteinhülle des Viruspartikels : der in Abschnitt B 1 beschriebene Prozeß konnte mit nur wenig reduzierter Ausbeute mit Proteinuntereinheiten durchgeführt werden, die durch Depolymerisierung mit Essigsäure aus reaggregierten Proteinhüllen dargestellt wurden.

Eine auffallende Eigenschaft der Proteinhüllen ist ihre große Stabilität. Im Gegensatz zu den reaggregierten Proteinstäbchen des TMV, die bereits für $p_H > 6$ in kleinere Aggregate zerfallen, bleiben die leeren Proteinhüllen des fr in 0,1 m Glykokoll/NaOH-Puffer + 0,1 m NaCl bis p_H 11,6 intakt. Wie Analysen des Sedimentationsverhaltens zeigen, zerfallen sie bei weiterer p_H-Erhöhung in monomere Untereinheiten. Die große Akali-Stabilität haben die Reaggregationsprodukte mit den durch Entfernen der RNS aus intakten Viruspartikeln erzeugten Proteinhüllen anderer sphärischer Viren gemeinsam [30].

Alle bisher beschriebenen Resultate zeigen Übereinstimmung der Eigenschaften der Proteinhüllen von Viruspartikeln und von reaggregierten Teilchen. In einer Eigenschaft unterscheiden sich die Reaggregationsprodukte jedoch weitgehend vom Ausgangsmaterial : in ihrer starken Neigung zu interpartikulärer Aggregation. Diese Neigung führt zu einer im Vergleich zu Viruspräparaten gleicher Proteinkonzentration deutlich erhöhten Opaleszenz der Lösungen. Als Folgeerscheinung ist die

Löslichkeit der Reaggregationsprodukte erheblich kleiner als die der Virusteilchen. Die höchste erreichte Proteinkonzentration in 0,02 m Phosphatpuffer beträgt etwa 3 mg/ml, während für Viruslösungen leicht der 20-fache Wert erzielt wird. Häufig bildeten sich (vor allem beim Stehenlassen der Präparate für mehr als 24 Stunden) schon bei Proteinkonzentrationen von 0,5 mg/ml Präzipitate aus. - Die Ursache der beschriebenen Aggregationstendenz ist nicht bekannt.

1.3. Ein andersartiges Reaggregationsprodukt: Multischalen

In den letzten Abschnitten wurde gezeigt, daß durch Dialyse der nach B 1.3 erhaltenen, schwach alkalischen Proteinlösung gegen 0,02 m Phosphatpuffer von p_H 7,6 virusähnliche Proteinhüllen erzeugt werden können. Andersartige Partikel treten bei diesem p_H-Wert und Proteinkonzentrationen zwischen 0,1 und 1 mg/ml nicht auf. Erhöht man jedoch die Proteinkonzentration, so erhält man eine interessante, bisher unbekannte Art von Aggregaten *. Eine elektronenmikroskopische Aufnahme dieser Reaggregationsprodukte zeigt die Abb. 4. Die Partikel bestehen offenbar aus einer oder mehreren Proteinschalen, die an eine normale, virusähnliche Proteinhülle angelagert sind. In den meisten Fällen sind die zusätzlichen Schalen nicht vollständig geschlossen.

---

* Gleichzeitig mit der ersten Veröffentlichung der im folgenden beschriebenen Resultate [31] berichteten Bancroft et al. über ähnliche Erscheinungen bei der Reaggregation des Hüllproteins von cowpea chlorotic mottle virus [32, 33].

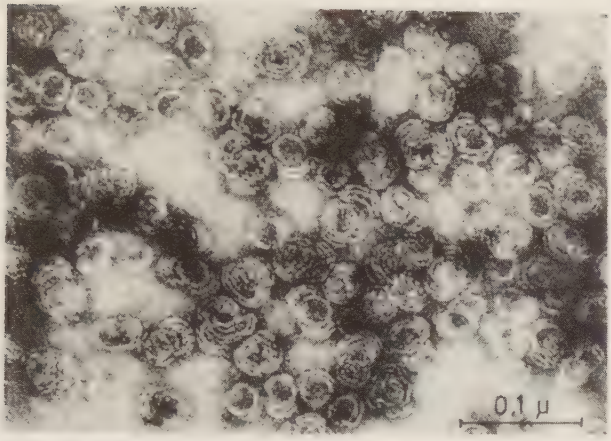


Abb. 4

Reaggregiertes fr-Protein : "Multischalen"

Sie sind überdies, wie man aus der häufig auftretenden Inkonstanz der Abstände zwischen benachbarten Schalen sieht, recht locker aneinander gebunden.

Die Bildung von "Multischalen" wird durch eine Erniedrigung des p_H-Wertes begünstigt. Dialysiert man die schwach alkalische Proteinlösung nicht gegen Phosphatpuffer von p_H 7,6, sondern gegen 0,02 m NaH_2PO_4 (p_H 4,6), so erhält man auch für Proteinkonzentrationen zwischen 0,5 und 1 mg/ml vorwiegend Multischalen. Beim Verdünnen der Lösungen oder bei Dialyse gegen Lösungen von höherem p_H nimmt die Zahl der anomalen Partikel und der zusätzlichen Schalen ab. Einen gleichartigen Einfluß hat die Erhöhung der Ionenstärke.

Es ist bemerkenswert, daß auf die Möglichkeit der Bildung der hier beschriebenen neuartigen Partikel bereits in der schon zitierten fundamentalen theoretischen Arbeit von Caspar und Klug hingewiesen wird (Ref. 1, S.19).

1.4. Folgerungen

In den vorangegangenen Abschnitten wurden Bedingungen beschrieben, unter denen durch Spaltung des sphärischen Bakteriophagen fr dargestellte monomere Proteinuntereinheiten in vitro zu einer Proteinhülle aggregieren, die in allen wesentlichen Eigenschaften mit der des Viruspartikels übereinstimmt. Weiter wurde gezeigt, daß der Aggregationsprozeß ohne Anwesenheit von Nukleinsäure ablaufen kann.

Mit diesem Ergebnis wird erstmals demonstriert, daß - wie im Falle des Hüllproteins des stäbchenförmigen TMV - auch für die Proteinhülle sphärischer Viren ein self-assembly-Prozeß möglich ist, der von monomeren Proteinuntereinheiten zur virusähnlichen Proteinhülle führt *. Die Information, die zur Ausbildung der Proteinhülle nötig ist, muß also bereits in der Struktur der Proteinuntereinheit enthalten sein; gleichzeitig ist offenbar die geschlossene Proteinhülle für das System von Proteinuntereinheiten der unter den vorliegenden Bedingungen

---

* Nach der ersten Veröffentlichung dieser Resultate [28] erzielten Bancroft et al. analoge Ergebnisse mit einem sphärischen Pflanzenvirus (cowpea chlorotic mottle virus) [33]. Allerdings ist in diesem Fall bisher nicht geklärt, ob das Ausgangsmaterial bis zu monomeren Proteinuntereinheiten depolymerisiert war.

energetisch begünstigte Zustand. Dieses Resultat ist ein weiterer Beweis für die Gültigkeit der von Caspar und Klug aufgestellten Theorie über die physikalischen Prinzipien beim Aufbau einfacher Viren [1].

Die Behauptung von Hohn, daß der beschriebene self-assembly-Prozeß nicht ohne Mitwirkung von Nukleinsäure möglich sei [9], ist durch die durchgeführten Experimente widerlegt. Die von diesem Autor unter Bezug auf die Hypothesen von Kellenberger [34] postulierte Existenz eines "morphopoetischen Faktors" ist für die Möglichkeit eines self-assembly-Prozesses des Hüllproteins einfacher sphärischer Viren nicht erforderlich.

2. Konformationsänderungen bei der reversiblen Depolymerisierung des fr-Proteins

2.1. Vorbemerkungen zur Problemstellung und zur Wahl der Meßmethode

Neben seiner Bedeutung als Demonstrationsmodell für die Möglichkeit einer selbstgesteuerten Aggregation von Proteinuntereinheiten sphärischer Viren hat der in den vorangegangenen Abschnitten beschriebene Prozeß der reversiblen Depolymerisierung der Proteinhülle des Bakteriophagen fr noch einen weiteren interessanten Aspekt. Bei der großen Stabilität der abgeschlossenen Proteinhülle erscheint es als zweifelhaft, ob eine Spaltung der Hülle ohne gleichzeitige Änderung der Konformation der Proteinuntereinheit möglich ist. Das gilt besonders für die in dieser Arbeit zur Depolymerisierung der Virushülle benutzte Essigsäure-Methode, da das Spaltungsreagenz die

Eigenschaften einer Säure mit denen eines organischen Lösungsmittels vereint. Beide Eigenschaften, vor allem aber die letztgenannte, führen im allgemeinen zu einer Proteinkonformation, die gegenüber dem Zustand in wässrigen, neutralen Puffern stark verändert ist. Für den beschriebenen Prozeß muß also bei der Depolymerisierung und während der nachfolgenden Behandlungsschritte mit Umfaltungen der Peptidkette gerechnet werden. Der Untersuchung dieser Konformationsänderungen ist der zweite Teil der vorliegenden Arbeit gewidmet.

Zur Untersuchung von Konformationsänderungen gelöster Proteinmoleküle stehen mehrere Meßmethoden zur Verfügung. Von den älteren Methoden ist besonders die Untersuchung der hydrodynamischen Eigenschaften der Moleküle (Viskosität, Diffusion, Sedimentation) zu nennen, die im wesentlichen von der Tertiärstruktur abhängige Meßgrößen liefert. Aussagen über die Tertiärstruktur erlauben auch Messungen der Röntgenkleinwinkelstreuung sowie der Lichtstreuung. Untersuchungen der UV-Absorption und der optischen Aktivität liefern dagegen vor allem Aussagen über die Sekundärstruktur der gelösten Moleküle. Andere Untersuchungsmethoden, wie Messungen des Deuterium-Austausches, der kernmagnetischen Resonanz sowie der Infrarot-Absorption, haben bisher wenig zur Kenntnis der Proteinkonformation beitragen können.

Von den genannten experimentellen Methoden ist die Untersuchung der optischen Aktivität - der Messung des Zirkular-Dichroismus oder der optischen Rotationsdispersion (ORD) - der Vorzug zu geben. Gegenüber den Meßmethoden für Änderungen der Tertiärstruktur haben ZD- und ORD-Messungen den Vorteil, nicht oder nur in geringem Maße auf unspezifische

Aggregation der Moleküle anzusprechen. Eine solche Aggregation tritt jedoch im Verlauf des untersuchten Prozesses im isoelektrischen Bereich des fr-Proteins (p_H 3 - 5) auf. Auch die Interpretation der Meßwerte ist weitaus einfacher als im Falle der hydrodynamischen Methoden. Für die Bevorzugung der ZD- und ORD-Messungen gegenüber der Bestimmung der UV-Absorption spricht vor allem der höhere Informationsgehalt der erstgenannten Verfahren.

Von den beiden Methoden zur Untersuchung der optischen Aktivität von Proteinlösungen hat sich in letzter Zeit die Messung des ZD weitgehend durchgesetzt, obgleich der Informationsgehalt und der benötigte meßtechnische Aufwand bei beiden Methoden etwa gleich groß ist. Die Gründe für die Bevorzugung der Messung des ZD gegenüber Messungen der Rotationsdispersion liegen in der einfacheren Struktur der ZD-Kurven [35]. Beim Vorliegen von Überlappungen von Cotton-Effekten, wie sie bei Proteinen die Regel sind, sind deshalb ZD-Messungen leichter zu interpretieren. Aus diesem Grunde wurde die Bestimmung des ZD auch für die vorliegende Untersuchung bevorzugt. Die Messungen wurden auf den Wellenlängenbereich zwischen 185 und 240 mμ, den Absorptionsbereich der Peptidbindung, beschränkt, da die ZD-Signale im Bereich der Seitenkettenabsorption (240 - 300 mμ) wenig zur Beschreibung der Sekundärstruktur des Moleküls beitragen können und überdies nahe der Nachweisgrenze der Apparatur liegen.

2.2. Die ZD-Signale im Verlauf des Reaggregationsprozesses

Nach Depolymerisierung der fr-Partikel in 11 m Essigsäure und Entfernen der RNS wurde durch Herabsetzung der Essigsäure-

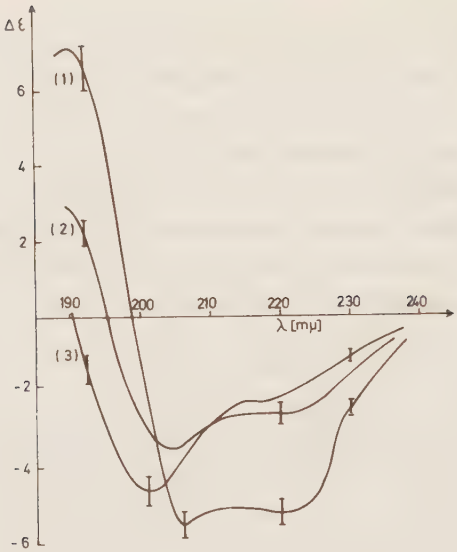


Abb. 5 a

Der Zirkular-Dichroismus des fr-Hüllproteins während des Prozesses der reversiblen Depolymerisierung. Lösungsmittel: Essigsäure. (1): 11 m, (2): 5,5 m, (3): 3 m

konzentration der Repolymerisierungsprozeß eingeleitet. Die im Verlauf des Prozesses auftretenden Zwischenstufen wurden durch ZD-Messungen charakterisiert. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in den Abb. 5 a - c gezeigt. Der Koeffizient der molaren dichroitischen Extinktion $\Delta\epsilon[cm^2/Millimol]$ ist auf das mittlere Molgewicht des Aminosäurerestes M = 111 bezogen. Zur Berechnung der angegebenen Kurven aus den Meßergebnissen wurde für den speziellen Extinktionskoeffizienten des fr-Proteins der Wert $\epsilon'(277\ m\mu) = (1,23 \pm 0,03)\ cm^2/mg$ benutzt. Dieser Wert wurde als Mittelwert aus 4 Messungen mit verschiedenen Proteinpräparaten erhalten. Alle Kurven stellen Mittelwerte aus mindestens 3, im allgemeinen aber 5 bis 8 Messungen dar. Die ange-

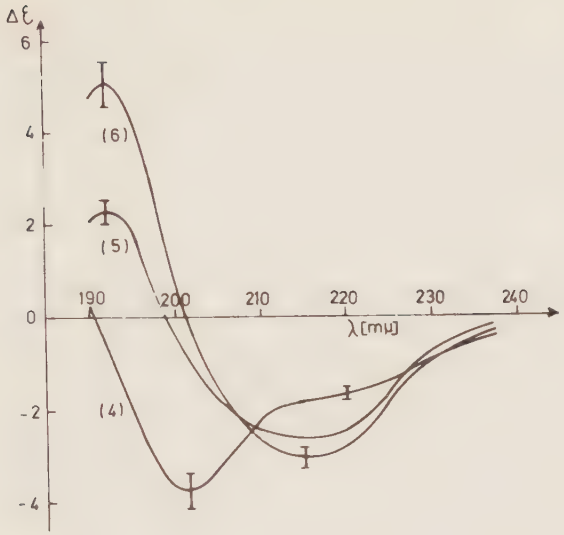


Abb. 5 b

Der Zirkular-Dichroismus des fr-Hüllproteins während des Prozesses der reversiblen Depolymerisierung. Lösungsmittel: Essigsäure. (4): 1 m, (5): 0,1 m, (6): 0,01 m

gebenen Fehler sind mittlere Fehler der Einzelmessung. Sie sind aus der Streuung der Meßwerte unter Berücksichtigung von Fehlern der Proteinkonzentration, der Schichtdicke sowie der Kalibrierung der Apparatur abgeschätzt. Die spektrale Bandbreite des optischen Systems betrug im gesamten Meßbereich etwa 1,5 mμ.

Wie man aus den Abbildungen sieht, ist in dem betrachteten Wellenlängenintervall der Zirkular-Dichroismus des fr-Proteins sehr stark vom Lösungsmittel abhängig. Dabei ändern sich nicht nur die Amplituden der ZD-Signale, sondern es tritt auch eine weitgehende Änderung der Wellenlängenabhängigkeit der

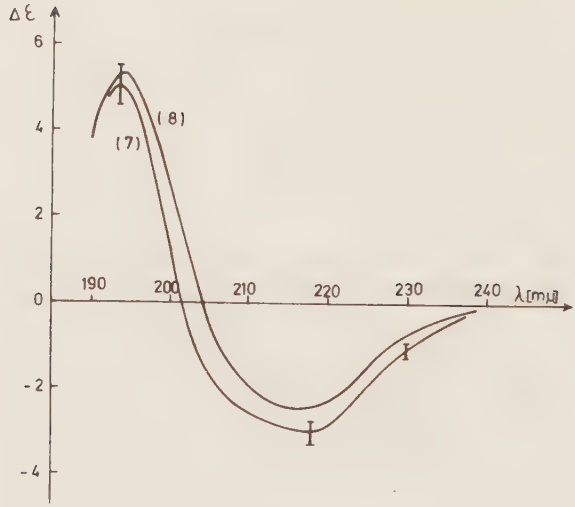


Abb. 5 c

Der Zirkular-Dichroismus des fr-Hüllproteins während des Prozesses der reversiblen Depolymerisierung. Lösungsmittel: (7): verdünnte Natronlauge (p_H 7,6), (8): 0,02 m Phosphatpuffer (p_H 7,6). Fehlerangabe für Kurve 8 s. Text.

Kurven auf. Die reversible Depolymerisierung ist also offensichtlich mit einer reversiblen Denaturierung gekoppelt. Der beschriebene Prozeß ist somit ein weiteres Beispiel für die Determinierung der Proteinkonformation durch die Primärstruktur der Peptidkette.

Im Verlauf des untersuchten Prozesses lassen sich deutlich vier Hauptstufen unterscheiden :

I. Nach der Spaltung, in 11 m Essigsäure, wird die Proteinkonformation durch einen negativen Zirkular-Dichroismus

im Bereich $\lambda > 199$ mμ ($\Delta\varepsilon = -5{,}5$, mit einem breiten Maximum zwischen 223 mμ und 205 mμ) und durch positive Signale für $\lambda < 199$ mμ ($\Delta\varepsilon = +7{,}1$, $\lambda_{max} = 190$ mμ) charakterisiert (Kurve 1 von Abb. 5 a). In diesem Lösungsmittel treten die größten im Verlauf der Untersuchung beobachteten Amplituden auf.

II. Bei Erniedrigung der Essigsäurekonzentration verschwinden die beschriebenen Signale und werden durch andere ersetzt. Der neue Kurventyp wird dominiert von einem negativen Cotton-Effekt mit einem Extremum bei etwa 201 mμ ($\Delta\varepsilon = -4{,}5$). Er ist in 3 m Essigsäure (Kurve 3) bereits voll ausgebildet und ändert Form und Amplitude bei weiterer Erniedrigung der Essigsäurekonzentration bis auf 0,3 m (Kurve 4, Abb. 5 b) praktisch nicht mehr.

III. Weitere Erniedrigung der Essigsäurekonzentration führt erneut zu einer starken Konformationsänderung. Das negative Extremum bei 201 mμ verschwindet, und neue Cotton-Effekte treten auf, deren Amplituden für $c(CH_3COOH) \leq 0{,}01$ m konstant bleiben (Kurven 5 und 6). Dieser Kurventyp bleibt auch nach dem Neutralisieren der gegen H_2O dialysierten Proteinlösung mit NaOH erhalten (Kurve 7, Abb. 5 c); er zeigt Maxima bei 216 mμ ($\Delta\varepsilon = -3{,}0$) und 192 mμ ($\Delta\varepsilon = 5{,}0$).

IV. Der letzte Schritt des Reaggregationsprozesses, bei dem durch Dialyse der schwach alkalischen Proteinlösung gegen Phosphatpuffer virusähnliche Proteinschalen erzeugt werden, wird begleitet von einer Rotverschiebung der ZD-Kurven um etwa 3 mμ (Kurve 8). Die Reproduzierbarkeit der Amplituden nimmt dabei stark ab; bei einem Wechsel der Probe änderten sich die ZD-Signale oft bis um den Faktor 2.

Höhere Proteinkonzentrationen führten meist zu größeren Werten von $\Delta\varepsilon$. Einen gleichgerichteten Einfluß hatte eine Verlängerung des Zeitraumes zwischen der Präparation der Probe und der Messung.

Kontrollmessungen ergaben, daß mit Ausnahme des unter IV beschriebenen Falles ein Einfluß der Proteinkonzentration auf die Ergebnisse in dem benutzten Konzentrationsbereich nicht feststellbar ist. Ohne Einfluß auf $\Delta\varepsilon$ ist weiter die Verwendung von reaggregierten Proteinhüllen anstelle von Virusteilchen bei der Spaltung sowie die Ausführung der Spaltungsreaktion bei niedrigerer Salzkonzentration. Auch die Verkleinerung der Spaltbreite und damit der spektralen Bandbreite des optischen Systems führte selbst an den Flanken der gemessenen Kurven nicht zu Amplitudenänderungen, welche die in den Abbildungen angegebenen Fehlergrenzen übersteigen. In der Umgebung der Extrema war ein Spaltbreiteneinfluß auf die Amplituden nicht nachweisbar. Diese Ausführungen gelten auch für die im folgenden beschriebenen Messungen.

2.3. Trennung von p_H- und Lösungsmitteleffekten

Um Aussagen über die Ursache der in C 2.2 beschriebenen Strukturänderungen machen zu können, muß der Einfluß des p_H-Wertes auf die Proteinstruktur von dem der Essigsäure als nichtwässrigem Lösungsmittel getrennt werden. Dazu wurden Proben aus 11 m Essigsäure (p_H 1,8) gegen HCl von p_H 1,8 sowie aus 1 m Essigsäure (p_H 2,4) gegen HCl von p_H 2,4 dialysiert und die ZD-Kurven der salzsauren Lösungen gemessen. Die Lösungen mit p_H 2,4 zeigten beim Entfernen der Essigsäure keine Änderung der ZD-Signale. Bei weiterer Dialyse gegen HCl-Lösungen von

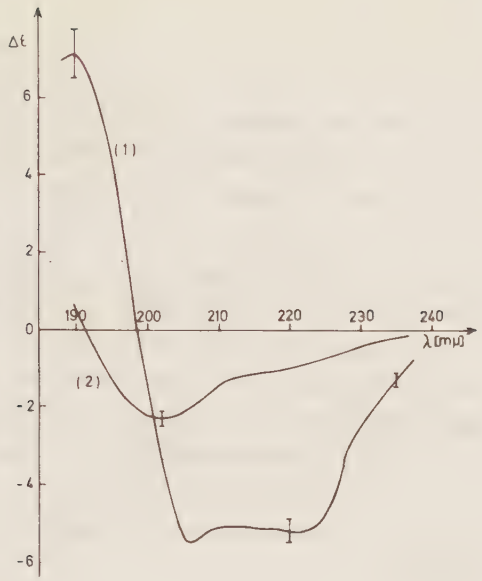


Abb. 6

Der Zirkular-Dichroismus des fr-Proteins (gespalten durch Essigsäure) in Lösungen mit p_H 1,8. (1): Essigsäure, (2): Salzsäure

höherem p_H wurden ebenfalls Ergebnisse erhalten, die mit denen der Essigsäurelösungen gleicher Wasserstoffionen-Konzentration übereinstimmten. Auch eine Reaggregation des Proteins zu virusähnlichen Hüllen war mit unverminderter Ausbeute möglich. Dagegen führte die Dialyse der Proteinlösung aus 11 m Essigsäure gegen HCl (p_H 1,8) zu erheblich veränderten ZD-Signalen, s. Abb. 6 . Ein Vergleich mit Abb. 5 zeigt, daß die Form der für die HCl-Lösung erhaltenen Kurve mit der für 3 m bis 0,3 m Essigsäure übereinstimmt; die Amplitude ist jedoch auf die Hälfte reduziert. Gleichzeitig mit der Änderung der ZD-Signale nimmt die Löslichkeit des Proteins auf etwa 1 mg/ml ab (Abb. 6 zeigt die am Überstand des niedertourig zentrifugierten Präparates gemes-

sene Kurve). Der Versuch, das so erhaltene Protein nach Dialyse gegen H_2O oder nach erneutem Zufügen von 2 Volumen Essigsäure und anschließender Behandlung nach Abschnitt B 1 zu virusähnlichen Teilchen zu reaggregieren, ergab nur eine geringe Ausbeute an solchen Teilchen. Der Hauptteil des Materials nahm die Form von amorphen Aggregaten an. Das zeigt, daß das Protein bei der durchgeführten Behandlung irreversibel denaturiert oder sogar in seiner chemischen Struktur verändert werden kann. - Bemerkenswert ist, daß sowohl die intakten Viruspartikel als auch die reaggregierten Proteinhüllen stabil gegen die Einwirkung von verdünnter HCl (p_H 1,8) sind. Das wurde durch elektronenmikroskopische Untersuchungen sowie durch Messung der Sedimentationsgeschwindigkeit in der Ultrazentrifuge gezeigt.

Der p_H-abhängige Vorgang der Umfaltung der Peptidkette für $p_H > 2{,}2$ bzw. $c(CH_3COOH) \leqslant 3$ m verdient besonderes Interesse. In Abb. 7 ist für diesen Prozeß $\Delta\varepsilon$ als Funktion des p_H-Wertes der Essigsäurelösungen aufgetragen. Die Abbildung zeigt deutlich die scharfe Begrenzung des Übergangsbereiches und den gut definierten Umschlagspunkt bei p_H 2,8. Gekoppelt mit diesem Umschlag der ZD-Signale ist eine Änderung des langwelligen Teils des Absorptionsspektrums, wobei sich das Maximum der UV-Absorption von 277 mμ auf 281 mμ verschiebt.

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen klar, daß die Spaltung des Viruspartikels bzw. der Proteinhüllen in 11 m Essigsäure sowie die damit verbundenen Konformationsänderungen der Proteinuntereinheit auf die besonderen Lösungsmitteleigenschaften und nicht auf den Säurecharakter der Essigsäure zurückzuführen sind. Dagegen ist die Rückfaltung der Peptidkette

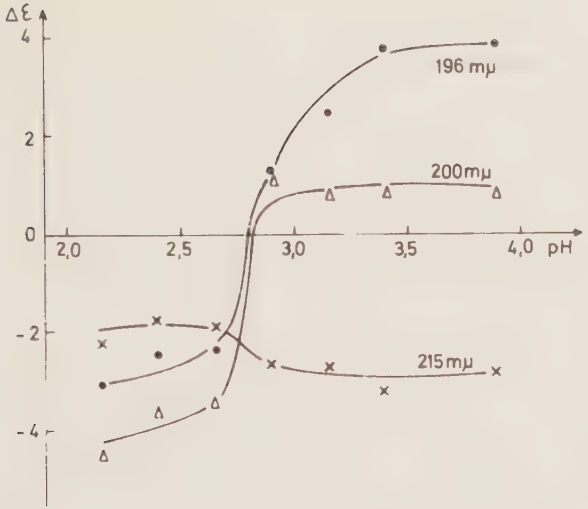


Abb. 7

Die p_H-Abhängigkeit des Zirkular-Dichroismus von fr-Protein (gespalten durch Essigsäure).

bei Erniedrigung der Essigsäurekonzentration von 0,3 m auf etwa 0,01 m allein durch die Änderung der Wasserstoffionen-Konzentration hervorgerufen.

2.4. Überlegungen zum Zustandekommen der ZD-Kurven für reaggregierte Proteinhüllen

Voraussetzung für die Gültigkeit der unter C 2.2 und C 2.3 durchgeführten Betrachtungen ist natürlich, daß eine Änderung der ZD-Signale tatsächlich Änderungen der Sekundärstruktur der Proteinuntereinheit anzeigt. An der Berechtigung dieser Voraussetzung für die in Abb. 5 a und b sowie in Abb. 6 gezeig-

ten ZD-Kurven ist sicherlich nicht zu zweifeln. Anders liegen die Verhältnisse jedoch bei dem unter C 2.2, IV beschriebenen Übergang von Kurve 7 zu der rotverschobenen Kurve 8, die an reaggregierten Proteinhüllen gemessen wurde (Abb. 5 c). Dieser Übergang tritt in ähnlicher Form als Begleiterscheinung von anderen Aggregationsvorgängen auf. So wurde er von Cassim und Yang bei der Aggregation von α-helikaler Poly-α-Glutaminsäure (PGA) gefunden [36]. Ebenso begleitet er den Aggregationsprozeß von Trimeren der Proteinuntereinheit des TMV ("A-Protein") zu virusähnlichen Proteinstäbchen (s.Abschnitt C 3). Der Kurventyp 8 wurde schließlich bei mehreren Untersuchungen an Membranen und Membranfragmenten beobachtet [37 - 39]. Verschiedentlich wurde versucht, den Effekt mit Änderungen der Sekundärstruktur des Proteins oder der lokalen Dielektrizitätskonstanten in Beziehung zu bringen [37, 39]. Kürzlich haben jedoch Urry und Ji gezeigt, daß eine teilweise Deutung der genannten Ergebnisse als Folgeerscheinung von Streueffekten möglich ist [40].

Ein Versuch, den Übergang von Kurve 7 zu Kurve 8 (Abb. 5 c) als Auswirkung von Änderungen der Sekundärstruktur zu erklären, muß infolge der Größe des Unterschiedes zwischen beiden Kurven zweifellos zur Annahme starker Umfaltungen der Peptidkette führen. Für die in dieser Arbeit untersuchten Systeme kann jedoch eine derartige Umfaltung bei der Aggregation, die im Falle des fr-Proteins durch eine geringfügige Erhöhung der Salzkonzentration, beim TMV-Protein durch eine ebenfalls geringfügige p_H-Änderung induziert wird, als höchst unwahrscheinlich angesehen werden. Insbesondere beim TMV-Protein sprechen alle bisher erhaltenen Ergebnisse dafür, daß der Aggregationsvorgang nicht mit wesentlichen Konformationsänderungen der Untereinheit verbunden ist [41]. Ähnliches gilt für den Einfluß

von Änderungen der lokalen Dielektrizitätskonstanten. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse können deshalb als deutlichster Beweis für die Berechtigung der von Urry und Ji benutzten Betrachtungsweise angesehen werden. Zur vollständigen Erklärung des unter C 2.2, IV beschriebenen Übergangs reichen die von diesen Autoren durchgeführten Überlegungen jedoch nicht aus. Insbesondere erklären sie nicht die Rotverschiebung des Nulldurchgangs der ZD-Kurven. Es erscheint als möglich, daß sich in dieser Nullpunktverschiebung das Vorhandensein einer zirkular-dichroitischen Streuung andeutet.

In der Deutungsweise der Kurve 8 als Ergebnis von Streueffekten können die bei allen ZD-Messungen an reaggregierten Proteinhüllen beobachteten Amplitudenänderungen beim Wechsel der Probe zwanglos als Folge von Änderungen der Teilchengröße infolge interpartikulärer Aggregation erklärt werden. Nach den in C 1.2 beschriebenen Resultaten ist die Neigung zu einer solchen Aggregation eine charakteristische Eigenschaft der Reaggregationsprodukte. - Bei Partikeln mit Teilchengewichten von weniger als $1 \cdot 10^6$ g/Mol sind Effekte der beschriebenen Art bisher nicht beobachtet worden. Es besteht deshalb kein Grund zu der Annahme, daß die Kurven 1 - 7 von Abb. 5 sowie die der folgenden Abbildungen durch Streueffekte in einem die Meßgenauigkeit übersteigenden Maße beeinflußt sind.

Die in diesem Abschnitt durchgeführten Überlegungen zeigen klar, daß als das zur "nativen" Sekundärstruktur der Proteinuntereinheit gehörige ZD-Signal nicht der an reaggregierten Proteinhüllen beobachtete, sondern der für $c(CH_3COOH) \leq 0{,}01$ m bzw. in verdünnter NaOH auftretende Kurventyp anzusehen ist.

2.5. Die Beiträge von Modellstrukturen zur Konformation der Peptidkette

Messungen von ZD und ORD haben nicht nur eine große Bedeutung als Methode zur Untersuchung von Änderungen der Proteinkonformation, sondern sie erlauben auch Aussagen über die Beteiligung von Modellstrukturen am Aufbau der Proteinuntereinheit. Solche Modellstrukturen sind vor allem die α-Helix und das statistische Knäuel. Ihr relativer Anteil an der Zusammensetzung der Strukturelemente kann durch Vergleich der ZD- oder ORD-Kurven des untersuchten Moleküls mit denen von vollständig helikalen bzw. statistisch geknäuelten synthetischen Polypeptiden ermittelt werden [42 - 44]. Die Methode hat bei synthetischen Polypeptiden und Proteinen mit einem hohen Gehalt an einer dieser Modellstrukturen zu guten Ergebnissen geführt. Jedoch bereits in diesen einfachen Fällen werden genaue Angaben durch die Unsicherheit der ZD- und ORD-Amplituden der als Eichsubstanzen benutzten Lösungen synthetischer Polypeptide erschwert [36,43,44]. Diese Unsicherheiten sind weitaus größer als die apparativ bedingten Fehler. Bei anderen Proteinen kommen hierzu noch erhebliche Schwierigkeiten, die ihre Ursache in der mangelnden Kenntnis der Signale von ß-Strukturen [45, 46] und anderen Strukturelementen sowie der Beiträge der Seitenkettenchromophoren [47] haben. Eine weitere wesentliche Schwierigkeit erhebt sich bei der genauen Betrachtung der mit dem Begriff des statistischen Knäuels und seiner optischen Aktivität zusammenhängenden Fragen. Für eine Diskussion dieses Problems muß auf die Ausführungen von Schellmann und Schellmann verwiesen werden [48]. Hier sei nur bemerkt, daß die an den "statistisch geknäuelten" synthetischen Polypeptiden gemessenen ZD- und ORD-Signale durchaus auch

als das Ergebnis einer Nahordnung der Peptidkette gedeutet werden können, während ein wirklich ungeordnetes Knäuel vermutlich keinen Beitrag zu dem von der Sekundärstruktur der Peptidkette gelieferten Beitrag zur optischen Aktivität eines Proteinmoleküls liefert.

Die geschilderten Schwierigkeiten führen natürlich auch für die am fr-Hüllprotein durchgeführten Messungen zu einer Einschränkung der Aussagemöglichkeiten. Dennoch erlaubt die Ähnlichkeit der meisten der im Verlauf der Untersuchungen erhaltenen Kurven mit den für die Modellsubstanzen beschriebenen [43, 44] einige semi-quantitative Angaben über die Konfiguration der Proteinuntereinheit. So zeigen die in 11 m Essigsäure gemessenen ZD-Signale (Kurve 1 von Abb. 5) die typische Kurvenform der α-Helix, wenn auch das Verhältnis der Absolutwerte der Amplituden bei 192 mμ und 207 mμ kleiner als das für eine reine α-Helix in wässrigen Puffern ist (dieser Effekt wird möglicherweise durch einen direkten Einfluß des Lösungsmittels, das unterhalb von 210 mμ stark absorbiert, auf die Rotationsstärke des 192 mμ-Überganges verursacht). Vergleicht man die Amplituden der Maxima mit den Mittelwerten der Ergebnisse aus Ref. 43 und 44, die an vollständig α-helikalen synthetischen Polypeptiden erhalten wurden ($\Delta\varepsilon(208, 222\ m\mu) = -10{,}0$, $\Delta\varepsilon(192\ m\mu) = 22$), so ergibt sich unter Berücksichtigung der beschriebenen Unsicherheiten ein Helixgehalt von (45 ± 10) % (ohne Korrektur für den Brechungsindex des Lösungsmittels). Der bei der Erniedrigung der Essigsäurekonzentration auf 3 m bis 0,3 m auftretende Kurventyp (Kurven 3 und 4 von Abb. 5) entspricht in seinem kurzwelligen Teil ($\lambda < 210$ mμ) dem eines statistischen Knäuels, seine maximale Amplitude beträgt etwa 40 % des an der entsprechenden Form von PGA

beobachteten Wertes. Die für Essigsäurekonzentrationen von 0,01 m und weniger sowie in NaOH (p_H 7,6) auftretenden Signale (Kurven 6 und 7) sind schließlich wiederum helixähnlich, sie deuten auf einen Helixgehalt von (25 ± 5) % hin. Die Kurven 2 und 5 stellen eine Superposition von Kurven beider Modellstrukturen dar. Beiträge von anderen Strukturelementen oder von Seitenkettenchromophoren zeigen sich im Verhalten der Kurven 3 und 4 für $\lambda > 210$ mμ sowie am Fehlen der für die α-Helix charakteristischen Maxima bei 222 und 207 mμ in den Kurven 6 und 7. - Auffallend ist, daß bei allen durchgeführten Messungen mehr als 50 % der Peptidbindungen keinen Beitrag zu den ZD-Signalen liefern. Es ist ungewiß, ob diese Erscheinung durch die Anwesenheit einer erheblichen Zahl von zueinander spiegelbildlichen Strukturelementen oder durch das Vorhandensein großer Bereiche ohne Ordnungsstruktur (mit statistischer Faltung ?) verursacht wird. Die letztgenannte Möglichkeit erscheint als wahrscheinlicher, insbesondere bei Beachtung der mit dem Begriff des statistischen Knäuels verbundenen Schwierigkeiten.

Zusammenfassend ergibt sich, daß beim Prozeß der reversiblen Depolymerisierung folgende Proteinkonformationen als charakteristische Zwischenstufen auftreten: eine durch einen Helixgehalt von etwa 45 % charakterisierte Struktur in 11 m Essigsäure, eine weitgehend statistische Faltung für Essigsäurekonzentrationen von 3 m bis 0,3 m und eine wiederum durch ein helixähnliches Signal gekennzeichnete Struktur für Essigsäurekonzentrationen von weniger als 0,01 m. Diese Struktur ist als die native anzusehen; sie besitzt einen Helixgehalt von 25 %. Alle sonst auftretenden Strukturen stellen im wesentlichen Übergänge zwischen den genannten Konformationen dar.

Die Folgerungen über den Helixgehalt der nativen Proteinuntereinheit von fr weichen erheblich von den Angaben von Oriel und Koenig ab [49]. Diese Autoren konnten im Protein des fr-ähnlichen Phagen MS 2 praktisch kein Helixsignal finden. Das zu den Messungen benutzte Protein nimmt jedoch, abweichend zu den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Resultaten, in schwach alkalischen Pufferlösungen nicht die Form von virusähnlichen Hüllen an. Offensichtlich führt also die von Oriel und Koenig benutzte Präparationsmethode nicht zu nativem Protein.

2.6. Die Ursachen der Strukturänderungen

Die im letzten Abschnitt abgeleiteten Resultate ermöglichen, zusammen mit den Ergebnissen von C 2.3, eine weitgehende Klärung der Ursachen der beim Prozeß der reversiblen Depolymerisierung der fr-Proteinhülle beobachteten Strukturänderungen. Erleichternd wirkt sich dabei aus, daß die Strukturänderungen in deutlich ausgeprägten Stufen ablaufen.

Der erste dieser Vorgänge, der bei der Spaltung der Proteinhülle in 11 m Essigsäure auftretende Übergang von der nativen zu einer stärker helikalen Konformation, ist nicht durch den p_H-Wert der Lösung, sondern durch spezielle Lösungsmitteleigenschaften der Essigsäure bedingt. Die wichtigste dieser Eigenschaften ist das Vorhandensein von Hydrocarbongruppen, also "hydrophoben" Gruppen. Sie führt dazu, daß in 11 m Essigsäure die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Seitenketten der Peptidkette gegenüber wässrigen Pufferlösungen stark herabgesetzt werden. Weiter wird die kompetitive Wirkung der H_2O-Moleküle auf die Ausbildung von Wasserstoffbrücken innerhalb

der Peptidkette vermindert. Als Folgeerscheinung ist ein Aufbrechen der nativen Konformation und die Ausbildung zusätzlicher α-helikaler Bereiche zu erwarten [50], was mit den Ergebnissen der Messungen übereinstimmt.

Beim Entfernen des Hauptteils der Essigsäure entfällt der geschilderte Einfluß der Essigsäuremoleküle auf die Konformation der Peptidkette. Die in den Abschnitten C 2.2 und C 2.3 beschriebenen Resultate zeigen, daß bei diesem Vorgang für $p_H < 2,6$ keine Wiederherstellung der in der nativen Struktur vorhandenen hydrophoben Bindungen eintritt. Die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den gleichsinnig (positiv) geladenen Seitenketten des Proteinmoleküls verhindern offenbar die Ausbildung einer Ordnungsstruktur. Die Peptidkette nimmt deshalb eine weitgehend statistische Faltung an. Dieser durch die Aufhebung der Stabilisierung durch das organische Lösungsmittel verursachte Übergang von einer helikalen in eine ungeordnete Struktur führt zu den Kurven 2 und 3 von Abb.5.

Die wohl interessanteste Erscheinung im Verlauf des Reaggregationsprozesses ist die p_H-abhängige Rückfaltung der Peptidkette aus der ungeordneten in die native Konformation. Da der p_K-Wert des Überganges 2,8 ist, kann sie ihre Ursache nur in der Ionisierung einer oder mehrerer Carboxylgruppen, und zwar der Seitenkettengruppen der Asparagin- und Glutaminsäurereste oder der Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure (Tyrosin [16]) haben. Tanford gibt für die p_K-Werte dieser Gruppen in Proteinen und Modellsubstanzen 4,6 (Seitenkettencarboxylgruppen) bzw. 3,6 (C-terminale Gruppe) an [51]. Berücksichtigt man, daß in einer weitgehend statistisch gefalteten Peptidkette durch nicht zugängliche Gruppen verursachte Anomalien im

Titrationsverhalten unwahrscheinlich sind, so erscheint es als nötig, die Ursache der Strukturänderung in der Ionisierung der Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure zu sehen. Für diese Deutung spricht auch die Ausdehnung des Übergangsbereiches, die derjenigen entspricht, die bei der Titration einer einzigen Gruppe auftritt. Vermutlich führt die Wechselwirkung der neu entstehenden negativen Ladung mit den positiven Ladungen benachbarter Seitenketten zu einer Konfiguration, welche die Rückbildung hydrophober Bindungen ermöglicht. Zur endgültigen Klärung dieser Frage sind jedoch weitere Versuche nötig.

Zusammenfassend ergibt sich für die bei dem untersuchten Prozeß der reversiblen Depolymerisierung auftretenden Konformationsänderungen folgendes Bild:

Bei der Spaltung der Proteinhülle in 11 m Essigsäure ändert sich - als Ursache oder Begleiterscheinung der Spaltung - die Sekundärstruktur der Untereinheit. Die neue, stärker α-helikale Struktur wird durch die Lösungsmitteleigenschaften der Essigsäure stabilisiert. Der Gleichgewichtszustand, der dem p_H-Wert der Lösung entspricht, ist dagegen eine weitgehend statistisch geknäuelte Peptidkette. Dieser Zustand wird beim Entfernen der Essigsäure durch Dialyse gegen H_2O durchlaufen, wobei die helikalen Bereiche der Peptidkette verschwinden. Schließlich setzt in der Umgebung von p_H 2,8 eine Rückfaltung der Kette in die native Struktur ein. Diese Rückfaltung wird vermutlich durch die Ionisierung der C-terminalen Carboxylgruppe induziert.

3. Vergleichende Untersuchungen am TMV-Protein: Konformationsänderungen bei der reversiblen Depolymerisierung

3.1. Vorbemerkungen

Im Abschnitt C 2 wurde gezeigt, daß der Prozeß der reversiblen Depolymerisierung der Proteinhülle des Phagen fr von weitgehenden Änderungen der Sekundärstruktur der Proteinuntereinheit begleitet wird. Es erschien als interessant, zu untersuchen, ob dieses Verhalten eine spezielle Eigenschaft des fr-Proteins ist oder ob die beobachteten Strukturänderungen als Begleiterscheinung bei allen Prozessen der reversiblen Depolymerisierung nach der Essigsäure-Methode auftreten. Zur Klärung dieser Frage wurden die am fr-Protein durchgeführten ZD-Meßreihen für das Protein des TMV wiederholt. Dieses Virus wurde ausgewählt, weil es in jeder Hinsicht als Modellsystem anzusehen ist: es ist das bezüglich der chemischen und physikalischen Eigenschaften am besten untersuchte Virus, es war das erste Virus, an dem die Möglichkeit des self-assembly demonstriert wurde, und schließlich konnte zuerst an ihm die Eignung von Essigsäure zur Darstellung von nativem Virusprotein erprobt werden [17]. Für die Wahl des TMV-Proteins als Objekt der vergleichenden Untersuchung sprach weiter die Erwartung, daß die weitgehende Kenntnis der Eigenschaften dieses Systems nicht nur die Interpretation der ZD-Messungen am TMV-Protein, sondern auch der am fr-Protein erleichtern könnte.

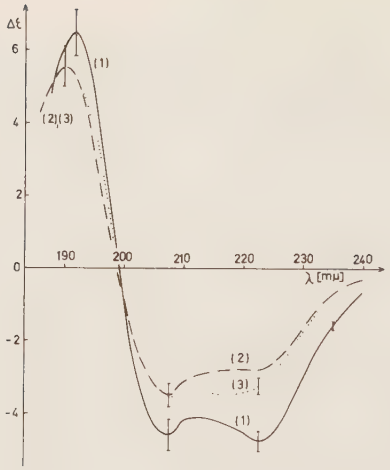
Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen dienten in 0,02 m NaH_2PO_4 gelöste Proteinstäbchen (TMV-Stamm "vulgare"), die nach der Methode von Fraenkel-Conrat präpariert wurden [17].

Die Vorbereitung der Proben für die ZD-Messungen sowie die Durchführung dieser Messungen erfolgte nach den für fr-Protein angegebenen Verfahren.

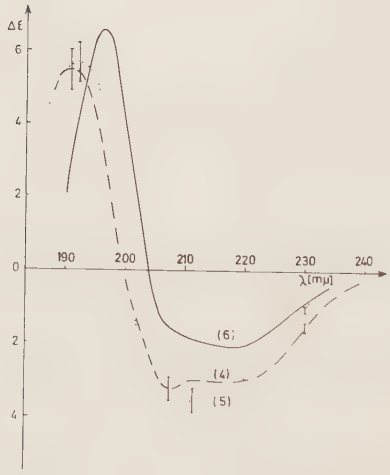
3.2. Die ZD-Signale im Verlauf des Reaggregationsprozesses

Die nach der Spaltung der Proteinstäbchen in 11 m Essigsäure und im Verlauf des Reaggregationsprozesses beobachteten ZD-Signale sind in Abb.8 dargestellt. Die angegebenen Werte von $\Delta\varepsilon$ sind auf ein mittleres Molgewicht des Aminosäurerestes von 111 bezogen[52]. Die Proteinkonzentration der Lösungen, die in dem beim fr-Protein benutzten Konzentrationsbereich lag, wurde aus Extinktionsmessungen unter Benutzung der speziellen Extinktionskoeffizienten $\varepsilon'(281\ m\mu) = 1{,}27\ cm^2/mg$ für Lösungen in 0,02 m Phosphatpuffer (p_H 7,6)[17] oder $\varepsilon'(279\ m\mu) = 1{,}18\ cm^2/mg$ für Lösungen in 5,5 m Essigsäure ermittelt.

Wie die Abb.8 zeigt, ist der Prozeß der reversiblen Depolymerisierung des TMV-Hüllproteins nicht mit starken Änderungen der Sekundärstruktur der Untereinheit verbunden. Die Kurven unterscheiden sich, mit Ausnahme derer für Protein in 11 m Essigsäure (Kurve 1) und für reaggregierte Proteinstäbchen (Kurve 6), nur wenig voneinander. In 11 m Essigsäure gelöstes Protein liefert ZD-Signale, die denen einer α-Helix entsprechen. Aus den Amplituden der Maxima läßt sich ein Helixgehalt von (42 ± 10) % abschätzen. Eine Herabsetzung der Essigsäurekonzentration auf 5,5 m bewirkt einen Rückgang der Amplituden auf etwa 3/4 des Wertes in 11 m Essigsäure, wobei die Kurvenform nahezu erhalten bleibt (Kurve 2). Bei weiterer Erniedrigung der Essigsäurekonzentration ändern sich die Kurven nur noch wenig; die Änderungen



8a



8b

Abb. 8 a,b

Der Zirkular-Dichroismus des TMV-Proteins während des Prozesses der reversiblen Depolymerisierung. Lösungsmittel für die Kurven 1 - 4: Essigsäure. (1): 11 m, (2): 5,5 m, (3): 1 m, (4): 0,1 m. Lösungsmittel für Kurve 5: 0,02 m Phosphatpuffer (p_H 7,6), für Kurve 6: 0,02 m NaH_2PO_4. Fehlerangabe für Kurve 6 s. Text.

liegen fast innerhalb der Fehlergrenzen (Kurven 3 und 4). Das gilt auch noch nach der Überführung des Proteins in 0,02 m Phosphatpuffer p_H 7,6, also für das "A-Protein" (Kurve 5). Der Helixgehalt beträgt jetzt (30 ± 5) %. Erst die Reaggregation des A-Proteins zu virusähnlichen Stäbchen führt zu abweichenden ZD-Signalen. Der neue Kurventyp zeigt gegenüber den helixähnlichen Kurven 1 - 5 eine Rotverschiebung um etwa 4 mu; daneben findet eine deutliche Reduzierung der Amplituden für $\lambda > 205$ mμ im Vergleich zu der des kurzwelligen Maximums statt. Gleichzeitig nimmt die Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse stark ab. Ein Wechsel der Probe führt für Proteinkonzentrationen von weniger als 0,15 mg/ml (Schichtdicke 5 oder 10 mm) häufig zu Änderungen von $\Delta\varepsilon$ bis um den Faktor 1,5. Bei höheren Proteinkonzentrationen oder kleineren Schichtdicken waren die Abweichungen noch erheblich größer und erreichten für Proteinkonzentrationen von 5 mg/ml bzw. Schichtdicken von weniger als 0,1 mm den Faktor 3 . - Die Ursachen der Rotverschiebung der Kurven sowie der Abnahme der Reproduzierbarkeit wurden bereits im Zusammenhang mit ähnlichen Erscheinungen am fr-Protein diskutiert (vergl. Abschnitt C 2.4). Als zusätzlicher Effekt tritt offenbar für kleine Schichtdicken eine partielle Orientierung der Proteinstäbchen auf, die zu einer weiteren Verringerung der Reproduzierbarkeit der Amplitudenmessungen führt.

Der für den Helixgehalt des "A-Proteins" angegebene Wert stimmt mit dem Resultat überein, das von Simmons und Blout durch Ermittlung des Moffit-Parameters b_o aus ORD-Messungen erhalten wurde [53]. Ebenfalls bestätigt werden die Angaben von Anderer et al. über Änderungen der Konformation der Proteinuntereinheit bei der Depolymerisierung der Proteinstäbchen in

11 m Essigsäure [26]. Diese Resultate, die sich auf die Tertiärstruktur des Proteinmoleküls beziehen, wurden durch Messung der Röntgen-Kleinwinkelstreuung erhalten. Keine Übereinstimmung besteht dagegen zwischen den hier beschriebenen Ergebnissen und denen von Chien et al. [54] Diese Autoren untersuchten die Konformationsänderungen beim Prozeß der reversiblen Depolymerisierung des TMV-Proteins durch 2-Chloräthanol und führten dabei Vergleichsmessungen an durch Essigsäure depolymerisiertem Protein durch. Aus dem Verhalten der Drude-Konstanten λ_c [42], die durch ORD-Messungen im sichtbaren Spektralbereich bestimmt wurde, schlossen sie auf das Auftreten starker Änderungen der Sekundärstruktur. Es ist jedoch weithin anerkannt, daß der Wert von λ_c nicht als zuverlässige Meßgröße für die Konformation von Proteinmolekülen angesehen werden kann [55].

3.3. Folgerung

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, weisen das Hüllprotein von fr und von TMV neben der Ähnlichkeit im Molgewicht und im Helixgehalt der Untereinheit eine weitere Gemeinsamkeit auf, und zwar im Verhalten ihrer Quartärstruktur bei der Behandlung nach der Essigsäure-Methode. Die durchgeführten ZD-Messungen zeigen jedoch klar, daß sich diese Gemeinsamkeit nicht auf die die Änderungen der Quartärstruktur begleitenden Änderungen der Sekundärstruktur erstreckt. Zwar hat der erste Schritt des Prozesses, die Depolymerisierung des Hüllproteins in 11 m Essigsäure, bei beiden Virusproteinen einen gleichartigen Einfluß auf die Sekundärstruktur, nämlich die Erhöhung des Helixgehaltes. Während sich jedoch die Peptidkette des TMV bei der Erniedrigung der Essigsäurekonzentration anscheinend bald in eine der

nativen Konformation ähnliche Struktur zurückfaltet, geht der Wiederherstellung dieser Konformation beim fr-Protein ein nahezu vollständiger Zusammenbruch der Ordnungsstruktur der Untereinheit voraus. Es ist nicht bekannt, ob dieser Unterschied auf eine größere Stabilität der hydrophoben Bereiche des TMV-Proteins oder auf eine leichtere Renaturierbarkeit dieser Bereiche gegenüber denen der fr-Untereinheit zurückzuführen ist. Der Vergleich zeigt jedoch klar, daß die im Verlauf der reversiblen Depolymerisierung der Proteinhülle des fr beobachteten starken Konformationsänderungen nicht eine allgemeine Begleiterscheinung der Essigsäure-Methode, sondern eine spezifische Eigenschaft des fr-Proteins sind.

D. Zusammenfassung

Durch Anwendung der Essigsäuremethode von Fraenkel-Conrat ist es möglich, eine reversible Depolymerisierung der Proteinhülle des sphärischen Bakteriophagen fr durchzuführen. Der Vorgang umfaßt die Aufspaltung des Viruspartikels in monomere Proteinuntereinheiten und Nukleinsäure in 11 m Essigsäure, die Abtrennung der Nukleinsäure und abschließend, nach Entfernen der Essigsäure und einigen Zwischenschritten, die Wiederherstellung der im Phagen vorliegenden Quartärstruktur des Hüllproteins. Wie beim stäbchenförmigen TMV ist also auch bei sphärischen Viren eine spontane Aggregation von Proteinuntereinheiten zu virusähnlichen Teilchen möglich.

Neben den virusähnlichen Proteinhüllen treten unter abgewandelten Versuchsbedingungen auch Teilchen auf, bei denen ein virusähnlicher Kern von zusätzlichen Proteinschalen umgeben ist ("Multischalen").

Messungen des Zirkular-Dichroismus zeigen, daß der beschriebene Prozeß einer reversiblen Depolymerisierung der Proteinhülle von fr mit einer reversiblen Denaturierung der Proteinuntereinheit gekoppelt ist. Die Analyse der Messungen ergibt, daß dieser Denaturierungsvorgang mehrere Stufen aufweist: den Übergang von der nativen zu einer stärker helikalen Struktur bei der Spaltung der Proteinhülle, die Ausbildung einer ungeordneten Struktur beim Entfernen der Essigsäure und schließlich die p_{II}-abhängige Rückfaltung der Peptidkette in die native Konformation. Das Aufbrechen der nativen und der Übergang zu einer stärker helikalen Struktur in 11 m Essigsäure ist auf die Wirkung

der Essigsäure als organisches Lösungsmittel zurückzuführen, während der Übergang zum ungeordneten Knäuel beim Entfernen des Hauptteils der Essigsäure der Aufhebung dieses Lösungsmitteleinflusses bei gleichzeitiger Einwirkung einer hohen H^+-Konzentration ($p_H < 2,6$) zuzuschreiben ist. Die bei der weiteren Erniedrigung der H^+-Konzentration auftretende Rückfaltung der Kette in die native Konformation wird wahrscheinlich durch die Ionisierung der Carboxylgruppe der C-terminalen Aminosäure ausgelöst. Ein Vergleich mit dem Verhalten des TMV-Proteins erweist, daß die für das fr-Protein beschriebenen starken Konformationsänderungen nicht eine allgemeine Begleiterscheinung der Essigsäure-Methode, sondern eine spezifische Eigenschaft des fr-Proteins sind.

E. Literaturverzeichnis

1 D.L.D.Caspar und A.Klug, Cold Spring Harbor Symp. 27, 1 (1962).

2 G.Schramm, Naturwissenschaften 31, 94 (1943).

3 G.Schramm und W.Zillig, Z.Naturforschung 10b, 493 (1955).

4 H.Fraenkel-Conrat und B.Singer, Biochim.Biophys.Acta 24, 540 (1957).

5 J.Kaper, J.Mol.Biol. 2, 425 (1960).

6 P.D.Cooper, Virology 16, 485 (1962).

7 E.C.MacLean und C.E.Hall, J.Mol.Biol. 4, 173 (1962).

8 T.Sugiyama, R.R.Herbert und K.A.Hartmann, J.Mol. Biol. 25, 455 (1967).

9 T.Hohn, European J.Biochem. 2, 152 (1967).

10 J.B.Bancroft und E.Hiebert, Virology 32, 354 (1967).

11 C.Morgan, H.M.Rose, M.Holden und E.P.Jones, J.Exptl.Med. 110, 110 (1959).

12 K.M.Smith und G.I.Hills, J.Mol.Biol. 1, 277 (1959).

13 M.A.Epstein, J.Cell.Biol. 12, 589 (1962).

14 H.Hoffmann-Berling, D.A.Marvin und H.Dürrwald, Z.Naturforschung 18b, 876 (1963).

15 H.Frank, persönliche Mitteilung (1967).

16 B.Wittmann-Liebold, Z.Naturforschung 21b, 1249 (1966).

17 H.Fraenkel-Conrat, Virology 4, 1 (1957).

18 K.Strohmeier, in "Methods in Virology", Vol.II (Hrsg. K.Maramorosch und H.Koprowski). Academic Press, New York (1967).

19 M.Heisenberg, J.Mol.Biol. 17, 136 (1966).

20 M.Grosjean und M.Legrand, C.R.hebd.Seánces Acad. Sci. 251, 2150 (1960).

21 M.Grosjean und M.Tari, C.R.hebd.Seánces Acad.Sci. 258, 2034 (1964).

22 L.Velluz, M.Legrand und M.Grosjean, "Optical Circular Dichroism", Verlag Chemie, Weinheim (1965).

23 B.H.Billings, J.opt.Soc.America 39, 797 (1949).

24 G.Kortüm, "Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie", 4.Aufl., S.125. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1962).

25 H.K.Schachmann, "Ultracentrifugation in Biochemistry", Academic Press, New York (1959).

26 F.A.Anderer, O.Kratky und R.Lo, Z.Naturforschung 19b, 906 (1964).

27 H.G.Wittmann, Experientia 15, 174 (1955).

28 R.Herrmann, D.Schubert und U.Rudolph, Biochem. Biophys.Res.Commun. 30, 576 (1968).

29 R.Herrmann, persönliche Mitteilung (1968).

30 J.M.Kaper, Biochemistry 3, 486 (1964).

31 D.Schubert, R.Herrmann und G.Schramm, Symp. on Interactions Between Subunits of Biological Macromolecules, Cambridge (1968).

32 J.B.Bancroft, ibd.

33 J.B.Bancroft, G.W.Wagner und C.E.Bracker, Virology 36, 146 (1968).

34 E.Kellenberger, Sci.Am. 215/6, 32 (1966).

35 A.Moscowitz, in "Optical Rotary Dispersion" (C.Djerassi), McGraw Hill Book Company, New York (1960).

36 J.Y.Cassim und J.T.Yang, Biochem.Biophys.Res. Commun. 26, 58 (1967).

37 D.F.H.Wallach und P.H.Zahler, Proc.Natl.Acad. Sci.U.S. 56, 1552 (1966).

38 J.Lenard und S.J.Singer, Science 159, 739 (1968).

39 J.M.Wrigglesworth und L.Packer, Arch.Biochem. Biophys. 128, 790 (1968).

40 D.W.Urry und T.H.Ji, ibd. S. 802.

41 D.L.D.Caspar, Advan.Protein Chem. 18, 37 (1963).

42 E.R.Blout, in "Optical Rotary Dispersion" (C.Djerassi). McGraw Hill Book Company, New York (1960).

43 G.Holzwarth und P.Doty, J.Am.Chem.Soc. 87, 218 (1965).

44 L.Velluz und M.Legrand, Angew.Chem.internat.Edit. 4, 838 (1965).

45 R.Townend, T.F.Kumosinski, S.N.Timasheff, G.D. Fasman und B.Davidson, Biochem.Biophys.Res.Commun. 23, 163 (1966).

46 F.Quadrifoglio und D.W.Urry, J.Am.Chem.Soc. 90, 2760 (1968).

47 A.Rosenberg, J.Biol.Chem. 241, 5119 (1966).

48 J.A.Schellmann und C.Schellmann, in "The Proteins", Vol.II (Hrsg. H.Neurath). Academic Press, New York (1964).

49 P.J.Oriel und J.A.Koenig, Arch.Biochem.Biophys. 127, 274 (1968).

50 S.J.Singer, Advan.Protein Chem. 17, 1 (1962).

51 C.Tanford, Advan.Protein Chem. 17, 70 (1962).

52 F.A.Anderer, Advan.Protein Chem. 18, 1 (1963).

53 N.S.Simmons und E.R.Blout, Biophys.J. 1, 55 (1960).

54 Y.J.Chien, Y.S.Chang und T.C.Tsao, Scienta Sinica 14, 610 (1965).

55 C.Tanford, P.K.De und V.G.Taggart, J.Am.Chem. Soc. 82, 6028 (1960).

Diese Arbeit wurde in der Biochemischen Abteilung des Max-Planck-Instituts für Virusforschung, Tübingen, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. G. Schramm (†) ausführt.

Meinem verehrten Chef, Herrn Professor Schramm, bin ich für sein Interesse an dieser Arbeit und seine ständige Förderung und Ermutigung zu tiefem Dank verpflichtet.

Herrn Priv.-Doz. Dr. F.A. Anderer danke ich herzlich für wertvolle Hinweise und Diskussionen während der gesamten Dauer der Arbeit, besonders aber für seine großzügige Unterstützung nach dem Tode von Herrn Professor Schramm.

Herrn R. Herrmann und Frl. G. Oehlen danke ich für zahlreiche Diskussionen. Besonderen Dank schulde ich Frau B. Krafczyk, die nicht nur die Viruspräparation besorgte, sondern mit großer Sorgfalt auch einen Teil der ZD-Messungen durchführte, sowie Herrn U. Rudolph für seine Unterstützung beim Umbau und bei der Wartung der ZD-Apparatur.

Lebenslauf

Am 3. Mai 1939 wurde ich in Chemnitz als Sohn des Kaufmanns Fritz Schubert und seiner Frau Else, geb. Prenzel, geboren. Ich wuchs in Chemnitz auf und besuchte dort von 1945 an die Altchemnitzer Grundschule. 1952 übersiedelte unsere Familie nach Westberlin. Dort besuchte ich die Hermann-Ehlers-Schule in Berlin-Steglitz, an der ich im Februar 1958 das Abitur ablegte. Im Frühjahr 1958 begann ich an der Freien Universität Berlin mit dem Studium der Physik. Im Sommer 1961 legte ich die Diplom-Vorprüfung ab. Vom Sommersemester 1962 bis zum Frühjahr 1964 war ich als wissenschaftlicher Hilfsassistent am II. Physikalischen Institut der Freien Universität beschäftigt. An diesem Institut fertigte ich unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. R. Honerjäger vom Herbst 1962 bis zum Frühjahr 1964 meine Diplomarbeit an. Im Juli 1964 bestand ich die Diplom-Hauptprüfung mit der Note "sehr gut". Von November 1964 bis Juni 1966 arbeitete ich als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Angewandte Reaktorphysik im Kernforschungszentrum Karlsruhe. Seit Juli 1966 bin ich als wissenschaftlicher Assistent in der Biochemischen Abteilung am Tübinger Max-Planck-Institut für Virusforschung tätig. Im Rahmen dieser Tätigkeit, die vorwiegend biophysikalischen Problemen gilt, entstand unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Schramm (†) die Dissertation über "Die reversible Depolymerisierung der Proteinhülle des Bakteriophagen fr", die im März 1969 abgeschlossen wurde.

Meine akademischen Lehrer in Berlin und Tübingen waren die Herren Professoren

Dr. M. Auwärter
Dr. A. Dinghas
Dr. H. Friedrich-Freksa
Dr. A. Gierer
Dr. K.P. Grotemeyer
Dr. R. Honerjäger
Dr. K.F. Jahr
Dr. H. Krüger
Dr. H. Lassen
Dr. W. Lautsch
Dr. G. Ludwig
Dr. H.H. Ostmann
Dr. M. Päsler
Dr. W. Reichardt
Dr. W. Schäfer
Dr. P.W. Schenk
Dr. G. Schramm
Dr. A. Stöhr
Dr. K. Vetter.

BAMBERGER FOTODRUCK - RUDOLF RODENBUSCH
8600 BAMBERG - Markusplatz 22 - Tel.: 0951/62794